



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 42 00 043 A 1

51 Int. Cl. 5:  
C 07 K 15/06  
C 07 K 15/28  
C 07 K 15/04  
C 07 H 21/04  
A 61 K 37/02  
A 61 K 49/00

21 Aktenzeichen: P 42 00 043.2  
22 Anmeldetag: 2. 1. 92  
43 Offenlegungstag: 13. 5. 93

DE 42 00 043 A 1

30 Innere Priorität: 32 33 31  
11.11.91 DE 41 37 051.1 15.11.91 DE 41 37 716.8

71 Anmelder:  
Stein, Harald, Prof. Dr., 1000 Berlin, DE

74 Vertreter:  
Benedum, U., Dipl.-Chem.Univ.Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,  
8000 München

72 Erfinder:  
Stein, Harald, Prof. Dr.med.; Bürkop, Horst, Dr.med.;  
Latza, Ute, Dr.rer.nat., 1000 Berlin, DE

54 Lymphoides CD30-Antigen (Ki-1), dessen Protein- und die zugehörige Nucleotidsequenz, seine Herstellung sowie Mittel zur Diagnose und Untersuchung von Tumoren

57 Es werden das bei der Hodgkinschen Krankheit auftretende lymphoide Oberflächenantigen CD30 (Ki-1), dessen Protein- und die zugehörige Nucleotidsequenz, seine gentechnische Herstellung, Mittel zur Diagnose und Untersuchung der Hodgkinschen Krankheit sowie die Verwendung dieser Nu-

cleotidsequenzen zur Schaffung transgener Tiere beschrieben. Die Erfindung stellt nicht auf monoklonalen Antikörpern basierende Mittel zur Untersuchung und Diagnose von anaplastischen großzelligen Lymphomen zur Verfügung.

20	T C H G N P S P Y Y D K - - A V R R C - - C - - Y R C P M - - G L F P T O Q C P Q R - - P T D C R	CD30 (1A)
204	A S K L T R A P D S P S - - S V G R - - - - - P S S D P - - G L S P T O P C P E G - - S G D C R	CD30 (1B)
39	T C R L R L E - - Y Y D O T - - A Q M C - - C - - S K C S P - - G O H A K V F C T K T S - - D T V C D	TNFR2 (1)
43	V C P O G K - - Y I H P O N - - N S I C - - C - - T K C H K - - G T Y L Y N D C P G P G O D T D C D	TNFR1 (1)
5	A C P T G L - - Y T H - - - - - S G E C - - C - - K A C N L - - G E G V A O P C G - - A N O T V C E	NGFR (1)
68	O C E P D - - - - - Y Y L D E - - A D R G T A C - - - - - V T C S R D - - D L V E K T P C A W - - N S S R V C	CD30 (2A)
273	O C E P D - - - - - Y Y L D E - - A G R C T A C - - - - - V S C S R D - - D L V E K T P C A W - - N S S R T C	CD30 (2B)
77	S C E O S T - - - - - Y T O L W N W V P E C L S C - - G S R C S S - - D O V E T O A C T R - - E O N R I C	TNFR2 (2)
83	E C E S G S F T A S E N H - - L R H C L S C - - - - - S K C R K E M - - G O V E I S S C T V - - D R O T V C	TNFR1 (2)
38	P C L D N V T F S D V V S A - - T E P C K P C - - - - - T E C L G - - L O S M S A P C V E - - A D D A V C	NGFR (2)
107	E C R P G M F C S T S - - - - - A V N S G A R C F F H S V C P A - - G M I V K F P G T A - - O K N T V C E	CD30 (3A)
119	T C R P G W Y C A L S K O - - - - - E G C R L C A P L R K C R P - - G F G V A R P G T E - - T S D V V C K	TNFR2 (3)
126	G C R K N O Y R H Y W S E N L - - F O C F N C - - - - - S L C L N - - G T V H L S - - C O E - - K O N T V C T	TNFR1 (3)
80	R C A Y G - - - - - Y Y O D E T - - G H C E A C - - - - - S V C E V - - G S G L V F S C O D - - K O N T V C E	NGFR (3)
282	E C R P G M I C A T S - - - - - A T N S C A R C V P Y P I C A A - - E T V T K P O D M A - - E K D T T F E	CD30 (3B)
163	P C A P G T F S N T T S T - - - - - D I G R P H - - - - - O I C N V - - - - - V A I P G N A - - S M D A V C T	TNFR2 (4)
167	C H A G F F L R E - - - - - N E C V S C - - - - - S N C K K - - - - - S L E C T K - - - - - L C L	TNFR1 (4)
148	E C P D G T Y S D E A N H V - - - - - D P C L P C - - - - - T V C E D - - T E R O L R E C T R - - W A D A E C E	NGFR (4)

DE 42 00 043 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft das bei der Hodgkinschen Krankheit auftretende lymphoide Oberflächenantigen CD30, dessen Protein- und die zugehörige Nucleotidsequenz, seine gentechnische Herstellung, Mittel zur Diagnose und Untersuchung der Hodgkinschen Krankheit sowie die Verwendung der Nucleotidsequenzen, insbesondere zur Schaffung transgener Tiere.

Die Hodgkinsche Krankheit (HD) wurde vor ca. 150 Jahren erstmals beschrieben, die Pathogenese dieses sehr häufigen humanen Lymphoms blieb jedoch weitgehend unverstanden. Erst seit der Identifizierung des auch als Ki-1 bezeichneten Oberflächenantigens CD30 ist eine Charakterisierung von Hodgkinschen (H) und Reed-Sternberg-Zellen (RS) — den Tumorzellen der Hodgkinschen Krankheit — möglich (Schwab et al. (1982) *Nature* 299, 65—67; Stein et al. (1982) *Int. J. Cancer* 30, 445—449; McMichael, Hrsg. (1987): *Leukocyte Typing III*, Oxford University Press Oxford).

Daß das Auftreten des CD30-Oberflächenantigens mit der Aktivierung der Lymphozyten einhergeht, haben Untersuchungen an in vitro stimulierten oder viral — durch HTLV-I, HTLV-II, EBV — transformierten T und B-Zellen gezeigt (Stein et al. (1985) *Blood*, 66, 848—858; Andreesen et al. (1984) *Blood*, 63, 1299—1302). Es besteht daher die feste Vermutung, daß Hodgkinsche und Reed-Sternberg-Zellen bösartig bzw. krankhaft veränderte T oder B-Zellen sind, und die bei der Hodgkinschen Krankheit beobachtbaren histologischen Variationen nur auf der Sekretion unterschiedlicher Cytokine beruhen (Stein et al. (1989) *Recent Results Cancer Res.* 117, 15—26.). Das CD30-Antigen besitzt daher vermutlich eine Schlüsselstellung bei der Tumorgenese und im interzellulären Signalsystem.

Nähere histologische Untersuchung an verschiedenen Tumorgeweben ergaben weiter, daß das CD30-Antigen auch zur Identifizierung einer morphologisch distinkten Gruppe von großzelligen anaplastischen Neoplasmen, die als CD30- oder Ki-1-positive anaplastische großzellige Lymphome (ALCL: engl. Ki-1<sup>+</sup> anaplastic large cell lymphoma) bezeichnet werden, geeignet ist. Diese besonders bei Kinder und Jugendlichen auftretende Tumore bilden eine separate Spezies von Lymphomen und werden auch als wahre histiocytische Lymphome (engl.: true histiocytic lymphoma) oder bösartige Histiocytose (engl.: malignant histiocytosis) genannt. Das gleichzeitige Auftreten von rearrangierten Ig- und T-Zell-Rezeptorgenen in der Mehrzahl der CD30-positiven ALCLs zeigt die lymphoide Natur dieser Tumorzellen. Die CD30-positiven ALCLs sind daher eine nicht nur phäno-, sondern auch genotypisch eine Einheit. CD30-positive ALCLs werden in primäre und sekundäre unterteilt und stammen zumeist von T-Zellen und Null-Zellen — weniger von B-Zellen — ab. Morphologisch werden die ALCLs wie folgt typisiert: a) common; b) Hodgkin-related; c) giant cell-rich und d) lymphohistiocytisch.

Zur Detektierung des CD30-Antigens standen bislang — definitionsgemäß — nur monoklonale Antikörper, insbesondere die monoklonalen Antikörper Ki-1 und Ber-H2, zur Verfügung (Schwab et al. (1982) *Nature* 299, 65—67; Schwarting et al. (1989) *Blood* 74, 1678—1689). Hierbei ist jedoch nachteilig, daß diese nur definierte Epitope auf dem Antigen erkennen und nicht zur Detektierung und Untersuchung der zugehörigen Nucleinsäuren geeignet sind. Eine Diagnostik, die nur auf der Erkennung einiger weniger Epitope basiert, ist aber ge-

genüber Artefakten anfällig und nicht umfassend. Einerseits hängt bekanntlich die Erkennbarkeit eines Epitops von der Fixierung und Präparierung der Probe ab, andererseits kann aber auch das zu erkennende Epitop des CD30-Antigens sich mit dem Status der Zelle ändern. Das Epitop kann bspw. durch Glykosylierung von benachbarten N- oder O-Glykosylierungsstellen gegenüber dem Antikörper blockiert sein. Und auch Phosphorylierungen, insbesondere Tyrosin-Phosphorylierungen, etc., bewirken oft erhebliche Konformationsänderungen im Protein, so daß das Epitop des monoklonalen Antikörpers verschwinden kann, insbesondere wenn das Epitop sich aus mehreren Abschnitten der Peptidkette zusammensetzt. Auch konnte das CD30-Antigen bislang nicht näher auf seine Eigenschaften als Rezeptor- bzw. Bindungsprotein hinsichtlich anderer Wachstums- und hormoneller Faktoren untersucht werden — einerseits wegen der geringen zur Verfügung stehenden Mengen, andererseits wegen seiner Eigenschaft als Membranprotein mit funktionell verschiedenen cytosolischen, transmembranen und extrazellulären Proteinabschnitten, die nachstehend auch Domänen genannt werden.

Der Erfindung liegt deshalb das Problem zugrunde, nicht auf monoklonalen Antikörpern basierende Mittel zur Untersuchung und Diagnose von anaplastischen großzelligen Lymphomen zur Verfügung zu stellen, um dadurch die Möglichkeit zur Untersuchung der Proteinfunktionen, der Tumorentstehung und der Behandlung dieser Krankheiten zu eröffnen.

Dieses Problem wird durch eine isolierte Nucleinsäure — durch eine DNA oder RNA —, die mit der in Fig. 2 gezeigten Nucleotidsequenz für das humane Lymphozyten-Aktivierungsantigen CD30 hybridisierbar ist, gelöst — insbesondere durch eine DNA oder RNA, die eine Sequenz der in Fig. 2 gezeigten Nucleotidsequenz enthält.

Die erfindungsgemäße Nucleinsäure kann laboranalytisch feststellbare Modifizierungen aufweisen, wie radioaktive Atome, fluoreszierende Farbstoffgruppen (Hawkins & Sulston (1990) *Technique*, Dec., 307) und/oder eingeführte Epitope für auf Licht basierende Systeme zum Nachweis von Nucleinsäuren. Die Epitope werden hierbei von hochspezifischen Antikörpern, die entweder selbst als Epitop für zweite Körper dienen oder direkt an ein Enzym für eine Nachweisreaktion — zumeist eine chemische Farbreaktion — gekoppelt sind, erkannt. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuren können in einer bevorzugten Ausführungsform an einem makroskopischen Träger — wie Beads, insbesondere Glas- und Sepharosekörper, Membranfilter, Nitrocellulosefilter, etc. — gebunden sein, um unter anderem dadurch CD30-RNA leichter durch Hybridisierung isolieren bzw. anreichern zu können.

Ein Aspekt der Erfindung sind ferner Klonierungsvektoren, die eine derartige DNA-Sequenz enthalten. Besonders geeignete Klonierungsvektoren sind unter anderem solche, mit denen die erfindungsgemäßen Nucleinsäuren amplifiziert werden können, z. B. pUR322, pUR101, M13mp10, M13mp11, M13mp18, M13mp19, pGEM1, etc.; ferner Vektoren, die eine Protein-Expression der klonierten DNA-Sequenzen in den Wirtszellen herbeiführen — z. B.  $\lambda$ gt11, pATH, etc., ferner Vektoren, die prokaryotische oder eukaryotische Wirtszellen transient transformieren, bspw. pCDM8 und Derivate, pRC/CMV, etc.; ferner Vektoren, die eukaryontische Wirtszellen stabil transformieren und in das Wirtsgenom integrieren, bspw. pXT1, etc.; ferner Vektoren, die zu Integration in das Genom von Keimbahnzellen

geeignet und somit zur Herstellung transgener Tieren geeignet sind, z. B. pSV2Neo, pRSVNeo, pMCFNeo, etc.

Die erfindungsgemäße Lehre umfaßt auch Wirtszellen, die CD30-Antigen, ein Fragment des CD30-Antigens, ein Hybridprotein mit CD30-Antigen oder Mutationen davon exprimieren. Insbesondere eukaryotische Wirtszellen, die CD30-Antigen in die äußere Zellmembran integrieren, mit posttranslationalen Modifikationen versehen, z. B. das CD30-Antigen in natürlicher Weise Glykosylieren bzw. mit komplexen Zuckermolekülen versehen, z. B. die in Beispiel 3 beschriebenen COS-Zellen, oder L929 Zellen, RK13 Zellen, WOP Zellen, R9ab Zellen.

Derartige durch rekombinante DNA-Verfahren hergestellte CD30-Moleküle sind in einer Ausführungsform der Erfindung bevorzugte Immunogene zur Herstellung von polyklonalen Antikörper und Antisera gegen das lymphoide CD30-Oberflächenantigen. So können z. B. Hybridprotein mit  $\beta$ -Galaktosidase und CD30-Antigenfragmenten aus den nachstehend beschriebenen  $\lambda$ gt-11-Klonen isoliert und als Immunogen verwendet werden. Ferner können chemisch CD30-Peptide gemäß der in Fig. 2 gezeigten aus der Nucleotidsequenz abgeleiteten Proteinsequenz synthetisiert, ggf. mit Glutardialdehyd oder einem anderen Kopplungsreagenz an einem geeigneten Träger — z. B. Albumin — gekoppelt, und als Immunogen zusammen mit Freund'schem Adjuvanz in ein geeignetes Tier — z. B. Maus, Kaninchen, Ziege, Schaf, etc. — injiziert werden. Die bio- und chemosynthetisch hergestellten CD30-(Hybrid)-Moleküle sind auch zur Verwendung in sogenannten Sandwich-Immunoabsorptionstest geeignet. Insbesondere können sie als Standard und zur Normierung dieser Immunotest, wie ELISA, RIA, EIA, etc. verwendet werden. Dadurch können diese raschen und preiswerten, in klinischen Labors allgemein gebräuchlichen Immunotestverfahren für diagnostische Zwecke eingesetzt werden, d. h. zum Nachweis von löslichem CD30-Antigen in Körperflüssigkeiten und Seren.

Die erfindungsgemäße Lehre beinhaltet ferner die Verwendung der obgenannten Nucleotidsequenzen zur Herstellung von transgenen Tieren, insbesondere Nagern, mit veränderter CD30-Antigen-Expression — mutiertem, insbesondere trankiertem CD30, Über- oder Unterexpression an CD30, einer Expression von CD30 in anderen Zellen und Geweben als Lymphozyten, vollständigem Fehlen eines intakten Strukturgens für CD30, konstitutiver oder induzierbarer Expression an CD30, einer Expression von CD30 an einer vorbestimmten Stelle bei der Differenzierung der Zellen. Derartige transgene Tiere sind hervorragende Modelle zur wissenschaftlichen Untersuchung von Lymphomen, zur Entwicklung von klinischen Test, zur Untersuchung von Blocker- und Induktor-Molekülen für den extrazellulären Rezeptorteil des CD30-Antigens.

Weitere bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind in den Neben- und Unteransprüchen beschrieben.

Die durch die erfindungsgemäße Lehre zur Verfügung gestellten Mittel und Verfahren ermöglichen nunmehr den Nachweis von CD30-Antigen kodierenden DNAs und RNAs durch Hybridisierung bzw. die Lokalisierung des Gens auf dem/den Chromosom(en). Ferner kann untersucht werden, ob in den Zellen, in der Probe eine Transkription des CD30-Gens erfolgt bzw. die Regulationsmechanismen zur Expression des CD30-Antigens.

Neben diesem mehr im wissenschaftlichen Bereich

liegenden Nutzungsmöglichkeiten, erlauben insbesondere die neueren Hybridisierungsverfahren — die PCR-Reaktion (polymerase chain reaction), die in situ Hybridisierung an Gewebsschnitten und Chromosomen — eine weitere und sehr empfindliche Diagnose. Insbesondere ist diese Diagnostik nicht mehr anfällig gegenüber posttranslationalen Modifikationen und Prozessierungen.

Die Untersuchungen auf chromosomaler Ebene (siehe Beispiel 2) legen ferner nahe, daß die Tumorgenese bei der Hodgkinschen Krankheit und anderen ALCLs wahrscheinlich auf Translokationen, Mutationen, Brüchen sowie viral induzierten Veränderung im Genom beruhen — hervorgerufen bspw. durch Viren wie Papilloma, insbesondere Papillomavirus Typ 16, Adenoviren, insbesondere Adonovirus Typ 12, Epstein-Barr-Virus oder Retroviren wie HTLV-1 und HTLV-2. Zumindest haben die Untersuchungen zur chromosomalen Lokalisierung des CD30-Strukturgens gezeigt, daß dieses auf der chromosomalen Bande 1p36 liegt. Das CD30-Gen liegt somit an einer fragilen Stelle im Chromosom (siehe: LeBeau (1986) Blood 67, 849-858), wo auch schon bei Neoplasien, wie Neuroblastomen und bösartigen Melanomen, chromosomale Abnormitäten festgestellt wurden. Hierbei ist besonders zu bemerken, daß bei non-Hodgkinschen Lymphomen, Veränderung — Duplikationen, Translokationen, Deletionen, etc. — in diesem chromosomalen Bereich auftreten, die zusammen mit der Expression des CD30-Antigens mit einem besonders raschen Tumorwachstum einhergehen. Die erfindungsgemäß zur Verfügung gestellten Nucleotidsequenzen sind somit hervorragende diagnostische Mittel für die Frage, ob bei Patienten derartige chromosomale Veränderungen aufgetreten sind und mit dem Auftreten der Hodgkinschen Krankheit oder verwandter großzelliger anaplastischer Lymphome gerechnet werden muß.

Die erfindungsgemäß zur Verfügung gestellten Nucleotidsequenzen sind im weiteren auch für eine pränatale Diagnostik geeignet, insbesondere wenn in der Familie derartige Erkrankungen bereits aufgetreten sind.

Weitere Vorteile, Ausführungsformen und Merkmale der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung in Verbindung mit den Figuren und Darstellungen. Es zeigen:

Fig. 1A klonierte cDNA-Abschnitte der CD30-Antigen-mRNA in  $\lambda$ gt11;

Fig. 1B die für das CD30-Antigen kodierenden Bereiche (schattiertes Rechteck) auf der mRNA und die nicht-kodierenden Regionen (Linien) mit den Polyadenylierungsstellen (Sterne);

Fig. 1C Restriktionskarte der cDNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen;

Fig. 1D Kartierung des CD30-Antigens nach den Epitopen der monoklonalen Antikörper Ki-1 und Ber-H2;

Fig. 2 die Sequenz des nicht-transkribierten Stranges der DNA, des kodierenden Stranges der DNA, sowie wie die daraus abgeleitbare CD30-Proteinsequenz;

Fig. 3 die Untersuchung verschiedener menschlicher Zelllinien auf CD30-mRNAs;

Fig. 4 ein Diagramm der hydrophoben und hydrophilen Eigenschaften der CD30-Aminosäuresequenz nach Kyte & Doolittle (1982) J. Mol. Bio., 157, 105 — 132;

Fig. 5 den Sequenzvergleich von CD30 mit Sequenzen aus der NGF-Rezeptor-Proteinfamilie;

Fig. 6 die Expression von CD30 in COS-Zellen, nachgewiesen durch eine Immunpräzipitation von  $^{125}$ I-markierten Zellen.

## Klonierung und Untersuchung der CD30-cDNA

Eine  $\lambda$ gt11-cDNA-Genbank von HUT102-Zellen (Poiesz et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7415–7419) bestehend aus ca. 200 000 Klonen wurde mit monoklonalen Antikörpern auf Hybridproteine mit CD30-Antigen getestet.

Die cDNA-Synthese nach Poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus HUT102-Zellen erfolgte gemäß Guebler & Hoffmann (1983) *Gene* 25, 263–269. Die cDNA wurde dazu abweichend mit einer Sepharose-CL4B-Säule größenlektiert (Eschenfeldt & Berger (1987) *Methods in Enzymol.*, 152, 335–337). Das Immunoscreening erfolgte mit einem Gemisch der monoklonalen Antikörper Ki-1 und Ber-H2 gemäß Huynh et al. (1985) in "DNA Cloning", A Practical Approach, Bd. 1, 49–78 (Hrsg.: Glover D.M., IRL Press, Oxford, Washington DC).

Ein Klon mit einer 909 Basenpaar langen cDNA produzierte ein Hybridpeptid, das der monoklonale Antikörper Ber-H2 erkannte.

Um einen Klon mit der gesamten Sequenz für CD30 zu erhalten, wurde eine pCDM8-Genbank aus HUT 102-Zellen hergestellt (Seed & Aruffo (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 3365–3369; Aruffo & Seed (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 8573–8577). Die cDNA wurde hierbei mit einem cDNA-Synthese-Kit der Firma Invitrogen synthetisiert, dann mit BstXI-Linkern versehen und schließlich auf einem 1,5%igen (w/v) Nu-Sieve Gel der Firma FMC größenfraktioniert. cDNA mit mehr als 1 kbp wurde aus dem Gel isoliert und mit dem Vektor pCDM8 ligiert. Die Transformation erfolgt in *E. coli*-MC1061/p3 durch Elektroporation gemäß Dover et al. (1988) *Nucl. Acids. Res.* 16, 6127–6145.

Die Koloniehybridisierungen erfolgten mit der durch das Immunoscreening der  $\lambda$ gt11-Bank erhaltenen CD30-1-cDNA-Frobe (Maniatis T., Fritsch E.F. Sambrook J. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York). Dieser Ansatz lieferte 5 in den cDNA-Sequenzen überlappende Klone (Fig. 1) mit 1,492 Bp (CD30-2), 1905 Bp (CD30-3 und CD30-4), 2342 Bp (CD30-5) und 2242 (CD30-6). DNA-Sequenzierungen erfolgten mit dem Sequenase Sequencing Kit der Firma US Biochemicals mit synthetischen Oligonucleotidprimern (Sanger et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74, 5463–5467).

Um auch den 3'Poly(A)-Ende zu klonieren, wurde eine PCR-Reaktion gemäß dem RACE-Protokoll (rapid amplification of cDNA ends) an revers transkribierter Poly(A)-RNA aus HUT102-Zellen durchgeführt (Frohman et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 5459–5463). Die Amplifikation erfolgte in 35 Zyklen bestehend aus: 1 Min. Denaturieren, gefolgt von 45 Sek. Anlagerung der Primer bei 54°C (Annealing) und 1,5 Min. Elongieren bei 72°C, mit internen und eine Sall-Stelle aufweisenden Oligo(dT)-Primern. Dabei wurde der Klon CD30-7 mit einer 333 Basenpaar langen cDNA erhalten.

Die DNA des Klons CD30-5 im Vektor pGEM1 wurde bei der DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen – gemäß dem Budapest Vertrag unter der Nummer DSM 6833 hinterlegt.

Die Sequenz der CD30-cDNA und die daraus ableitbare Proteinsequenz sind in Fig. 2 dargestellt. Das Signalpeptid und die transmembranen Domänen sind im Doppel unterstrichen, Polyadenylierungssignale sind einfach unterstrichen. Die Polyadenylierungsstellen sind durch Pfeile markiert. Die homologen Untereinheiten in

der extrazellulären Domäne sind gerahmt, potentielle N-Glykosylierungsstellen durch Sterne markiert, potentielle Phosphorylierungsstellen durch folgende Abkürzungen hervorgehoben: TYR (Tyrosinkinase), PKC (Proteinkinase C), CK2 (Caseinkinase II), AMP (cAMP/cGMP-abhängige Kinase).

Die vollständige Nucleotidsequenz der CD30-cDNA weist 3630 Basenpaare auf, wobei der G/C-Gehalt bei 62% liegt. Der offene Leserahmen geht von Nucleotid 231 bis Nucleotid 2015 – dem Terminationscodon. Das ATG-Codon zur Initiation der Translation ist von typischen Start-Sequenzen umgeben (Kozak (1986) *Cell* 44, 283–292). Der offene Leserahmen besteht aus zwei zu 77% homologen ca. 360 Bp langen Domänen (381–742 und 906–1270). Vor dem offenen Leserahmen befinden sich 230 Basenpaare nicht-translatierte Leader-Sequenz. Danach folgen 1613 Basenpaare untranslatierte Sequenz mit einer kurzen palindromischen Sequenz zwischen Nucleotid 2867 und 2888. Die ungewöhnlich lange 5'-Leadersequenz ist für die Expression nicht notwendig, denn eine cDNA ohne diese Sequenz, z. B. die aus Klon CD30-5 (siehe Beispiel 3), kann in COS-Zellen exprimiert werden.

Im untranslatierten 3'-Bereich befinden sich zwei Stellen für eine Polyadenylierung (durch einen Pfeil in Fig. 2 markiert), denen die ungewöhnlichen poly(A)-Signalsequenzen TGTAAG und AATAAT vorstehen. (Birnstiel et al. (1985) *Cell* 41, 349–359; Bardwell et al. (1985) *Cell* 65, 125–133; Sheets et al. (1990) *Nucl. Acids. Res.*, 18, 5799–5805).

## Verwendung von CD30-Nucleotidsequenzen zur Untersuchung von Zellen, Geweben und Chromosomen

## Beispiel 1

Northernblot-Analysen: Die Isolierung der RNAs aus den Zellen und Geweben erfolgte nach dem Guanidiniumisothiocyanat-Cäsiumchlorid-Verfahren von Chirgwin et al. (1979) *Biochemistry*, 18, 5294–5299. Die RNA wurde über eine Oligo(dT)-Cellulosesäule gemäß Swan et al. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 1408–1412 gereinigt. Die so erhaltene Poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurde dann auf einem 1,2%igen (w/v) Agarosegel mit 2,2 Mol/L Formaldehyd gelelektrophoretisch aufgetrennt – 2  $\mu$ g Poly(A)<sup>+</sup>-RNA pro Laufspur – auf Nitrocellulosemembranen übertragen und anschließend gegen <sup>32</sup>P-dCTP markierten CD30-DNA-Inserten hybridisiert. Die radioaktive Markierung der DNA erfolgte mit dem "DNA labeling kit" von Boehringer/Mannheim. Die Hybridisierungen erfolgte nach dem Verfahren von Thomas (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 1408–1412.

Eine derartige Northernblot-Analyse von RNA aus den menschlichen Zelllinien HUT102, SU-DHL-1 (Morgan et al. (1989) *Blood* 73, 2155–2164), L-428 (Schaadt et al. (1980) *Int. J. Cancer* 26, 723–731), L-591 (Diehl et al. (1982) *Cancer Treat. Rep.* 66, 615–632), L-540 (Diehl et al. (1981) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 101, 111–124) Co (Jones et al. (1985) *Hematol. Oncol.* 3, 133–145), Ho (Kamesaki et al. (1986) *Blood*, 68, 285–292), U-937 (Sundström & Nilsson (1976) *Int. J. Cancer* 17, 565–577), MDA-MB-231 (Cailleau et al. (1974) *J. Nat. Cancer Inst.* 53, 661–674) und HPB-ALL (Boylston & Cosford (1985) *Eur. J. Immunol.* 15, 738–742) sowie – zur Kontrolle – von POL-Zellen (periphere Blut-Lymphozyten)) ist in den Fig. 3A und B gezeigt; die Autoradiographie dauerte 4 Tage. Als Hybridisierungsprobe diente das

CD30-5-Insert mit dem kodierenden Bereich (Fig. 3A) und mit dem CD30-6/Bgl1-Xba1-Fragment des nicht-translatierten 3'-Endes (3B).

In den untersuchten Zelllinien können zwei RNAs nachgewiesen werden, eine größere mit ca. 3800 Nucleotiden und eine kleinere mit ca. 2600 Nucleotiden. Die RNAs beruhen wahrscheinlich auf verschiedenem Spleißen bei der Polyadenylierung.

Die Menge an CD30-kodierenden RNAs war am größten in der Zelllinie SU-DHL-1 und in der aus einem Hodgkinschen Lymphom stammenden Zelllinie L591. Es folgten die aus Hodgkinschen Lymphomen stammenden Zelllinien L540, L428, Ho, Co und schließlich die durch HTLV-1 transformierte Zelllinie HUT102. In Übereinstimmung mit dem Auftreten des CD30-Antigens waren keine RNA-Transkripte in peripheren Blutlymphozyten sowie den Zelllinien HPB-ALL, MDA-MB-231 und U-937 vorhanden. Dies zeigt die hohe Spezifität und Sensitivität der Hybridisierungsprobe.

#### Beispiel 2

Chromosomen-Kartierung: Durch PHA stimulierte periphere Blut-Lymphozyten-Isolate aus 2 gesunden Spenderpersonen wurden gemäß Stollmann et al. (1985), Br. J. Haematol., 60, 183-196, in Kultur durch Colchicin bei der Zellteilung in der Metaphase blockiert, die Chromosomen präpariert und daran eine in situ Hybridisierung gemäß Fonatsch et al. (1987), Recent Results Cancer Res., 117, 35-49, mit dem CD30-5/Smal-cDNA-Fragment, das die Sequenz zwischen der Smal-Stelle an Position 224 und der Smal-Stelle an Position 1738 enthält, durchgeführt. Die DNA wurde durch Nick-Translation mit  $^3\text{H}$ -dCTP,  $^3\text{H}$ -dTTP radioaktiv markiert. Die spezifische Aktivität der Probe betrug  $1,2 \times 10^7$  dpm/ug DNA. 99 Metaphasen wurden ausgezählt.

Diese Untersuchungen ergaben, daß das CD30-Gen auf der Chromosomenbande 1p36 liegt. 21,6% von 162 Silberkörner lagen spezifisch in diesem Bereich. Die  $\chi$ -Quadratwerte sind hochsignifikant ( $P < 0,001$ ).

#### Beispiel 3

Expression von CD30-Antigen in COS-Zellen: Hierzu wurden COS-Zellen mit CD30-5-cDNA transfiziert und dann das CD30-Antigen aus diesen Zellen immunpräzipitiert. Als Expressionsvektor wurde der pCDM8-Vektor verwendet, in dem das CD30-cDNA-Stück einkloniert war. Die Transfektion erfolgte an COS-1-Zellen in Zellkultur mit dem DEAE-Dextran-Verfahren (Seed & Aruffo (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 3365-3369). 48 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen isoliert, mit Hilfe von IODO-Beads (Warenzeichen der Firma Pierce) radioaktiv markiert, solubilisiert, die betreffende Proteine immunpräzipitiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Als Referenz wurden Oberflächenproteine von HUT 102-Zellen mit Hilfe von IODO-BEADS (Warenzeichen der Firma Pierce) radioaktiv markiert und mittels Anti-Maus-Ig-beschichteten Agarosebeads isoliert (Schwartz et al. (1989) Blood 74, 1678-1689).

Fig. 6 zeigt die elektrophoretische SDS-Gel-Analyse von mit monoklonalen Antikörper Ber-H2 immunpräzipitiertem CD30: Spur 1: Kontrolle mit Markerproteinen; Spur 2: Ber-H2-Präzipitat aus CD30-5-cDNA transfizierten COS-Zellen; Spur 3: Ber-H2-Präzipitat aus  $^{125}\text{I}$ -markierten HUT102-Zellen; Spur 4: BER-H2 Präzipitat aus mit insertlosem Vektor (pCDM8) transfi-

zierten COS-Zellen. Stets wurde eine einzige Proteinbande mit einem relativen Molekulargewicht von 120 000 gefunden.

Ferner wurden immuncytologische APAAP (alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase) Färbungen (Cordell et al. (1984) J. Histochem. Cytochem., 32, 219-229) durchgeführt. Dadurch konnten die Epitope der monoklonalen Antikörper Ki-1 und Ber-H2 anhand des Vergleichs, welcher monoklonale Antikörper mit welchem Hybridprotein bzw. trunkiert exprimiertem Protein reagierte, und der aus der cDNA-Karte abgeleiteten Aminosäuresequenz kartiert werden. Werden die Daten aus dem Immunoscreening der  $\lambda$ gt11-Bank und der APAAP-Immunfärbung kombiniert, dann kann das Ki-1-Epitop in der extrazellulären Domäne (siehe Fig. 1D) zwischen dem Aminoterminal und der Aminosäure 93, das Ber-H2-Epitop zwischen den Aminosäuren 112 und 416 lokalisiert werden.

#### Beispiel 4

Expression des CD30 Antigens in Kaninchenzelllinien RK13 und R9ab für die Immunisierung von Kaninchen zur Herstellung polyklonaler Seren gegen CD30. Hierzu werden die Zelllinien mit dem Vektor pCDM8-CD30-5 DEAE-Dextran transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion werden die Zellen geerntet und Kaninchen mit ihnen gemäß einem passenden Protokoll immunisiert.

#### Beispiel 5

Expression des CD30-Antigens in den Maus-Fibroblastenzelllinien L929 und WBP zur Herstellung weiterer monoklonaler Antikörper mit Ratten und Mäusen gegen CD30. Hierzu werden die Maus-Fibroblasten mit dem Vektor pCDM8-CD30-5 durch die DEAE-Dextran-Methode oder mittels Spheroblastenfusion (Sandri-Goldrin et al., Mol. Cell. Biol., 1, 743-752) transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion werden mit den Zellen Mäuse bzw. Ratten nach einem passenden Protokoll immunisiert. Für die Herstellung der Hybridome werden die Milzen der Tiere präpariert und die so gewonnenen Lymphozyten mit einer entsprechenden Maus-Myelom-Zelllinie fusioniert (Köhler G, Milstein C, Nature (1975), 256, 495-497).

#### Beispiel 6

Verwendung von rekombinant gewonnenem CD30 Antigen in RIAs, ELISAs, EIAs oder ähnlichen Immunodetektionssystemen zur Messung des bei bestimmten Erkrankungen in Seren vorkommenden, löslichen CD30 Antigens. Das CD30 kann hierfür durch Expression in Eukaryoten oder Prokaryoten unter Verwendung der angegebenen, möglicherweise leicht modifizierten Nucleinsäuresequenz, produziert werden. Nach affinitätschromatographischer Aufreinigung und Bestimmung des CD30-Gehaltes könnten solche Präparationen zur Standardisierung von CD30 Immuno-Assays dienen.

Die CD30-Peptidsequenz und die sich daraus ergebenden Anwendungsmöglichkeiten der Erfindung

Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz für das CD30-Antigen zeigt, daß das CD30-Polypeptid anderen transmembranen Wachstumsfaktorrezeptoren gleicht. Insbesondere die erste - weniger die zweite - Cystein-reiche Untereinheit der extrazellulären Domä-

ne gleicht den extrazellulären Domänen anderer bekannter Rezeptoren (siehe Fig. 5). Gemeinsamkeiten bestehen im wesentlichen mit den menschlichen Nerve-Growth-Factor -RezeptorProteinfamilie (NGFR — nerve growth factor receptor), z. B. NGFR, TNFR-I, TNFR-II (Schall et al. (1990) Cell, 61, 361—370; Heller et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 6151—6155; Loetscher et al. (1990) Cell, 61, 351—359; Kohno et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 8331—8335; Engelmann et al. (1990) J. Biol. Chem., 265, 1531—1536; Smith et al. (1990) Science 248, 1019—1023) und dem menschlichen Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor-geringer-Affinität (Johnson et al. (1986) Cell 47, 545—554).

Die extrazelluläre Domäne von CD30 kann in 6 cysteinreiche Proteinmotive von 40 Aminosäuren unterteilt werden (siehe Fig. 4), die — ausgenommen der verkürzten Motive 1B und 3B — jeweils 6 Cysteinreste aufweisen. Wie bei anderen Mitgliedern der NGFR-Proteinfamilie sind die Positionen der Cysteine in diesen Unterdomänen hoch konserviert. Daneben bestehen noch Homologien zu den entsprechenden Bereichen folgender Rezeptoren: Humaninsulinrezeptor-ähnlicher-Rezeptor (engl. human insulin receptor-related receptor; Shier & Watt (1989) J. Biol. Chem., 264, 14 605—14 608); transformierender-Wachstumsfaktor- $\beta$ 1-Bindeprotein (engl.: transforming growth factor- $\beta$ 1 binding protein; Kanzaki et al. (1990) Cell, 61, 1051—1061); Maus-Interleukin-3-Rezeptor (Gorman et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 5459—5463); sevenless-Protein der Fruchtfliege (Michael et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 5351—5353).

Auf DNA-Ebene bestehen ferner Homologien zu anderen Wachstumsfaktor-Rezeptoren, insbesondere zu Human-Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor-4 (Patanen et al. (1991) EMBO J. 10, 1347—1354).

Die Resultate der Sequenzvergleiche ergeben somit, daß auch das CD30-Antigen höchstwahrscheinlich ein Rezeptor für einen Wachstumsfaktor ist. Deshalb liegt es nahe, die erfindungsgemäß zur Verfügung gestellten Nucleotid- und Proteinsequenzen von CD30 für Rezeptorstudien zu verwenden. Einerseits zur Untersuchung der Frage, welche Faktoren überhaupt an CD30 binden, in welcher Weise — kompetitiv oder konstitutiv — die Bindung beeinflußt werden kann und welche Auswirkungen die Bindung der Liganden für die Zelle hat.

Insbesondere bietet sich mit Hilfe der zur Verfügung gestellten Nucleotidsequenz die Schaffung transgener Tiere zur Untersuchung des Rezeptors und des damit verbundenen Signalsystems an.

#### Patentansprüche

1. Isolierte Nucleinsäure, insbesondere eine DNA oder RNA, die mit der in Fig. 2 gezeigten Nucleotidsequenz für menschliches Lymphozyten-Aktivierungsantigen CD30 hybridisierbar ist.
2. Nucleinsäure gemäß Anspruch 1, die eine Sequenz der in Fig. 2 gezeigten Nucleotidsequenz enthält.
3. Nucleinsäure gemäß Anspruch 1 oder 2, die ein in vitro hergestelltes Poly- oder Oligonucleotid ist.
4. Nucleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, die ein oder mehrere laboranalytisch feststellbare Modifizierungen ausgewählt aus der Gruppe: radioaktive Atome, Farbstoffgruppen, eingeführte Epitope für auf Licht oder enzymatische Farbstoffreaktionen basierende Systeme zum Nachweis von Nucleinsäuren, aufweist.

5. Nucleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, die an einem makroskopischen Träger gebunden ist.
6. Klonierungsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß dieser eine DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 enthält.
7. Klonierungsvektor gemäß Anspruch 6, der ein oder mehrere Selektionsmarker aufweist.
8. Klonierungsvektor gemäß Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA unter der Kontrolle eines konstitutiven und/oder induzierbaren Transkriptionspromotors steht.
9. Wirtszelle, die mit einem Vektor gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8 transformiert wurde.
10. Wirtszelle gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß diese CD30-Antigen oder Fragmente davon, ein Hybridprotein mit CD30-Antigen und/oder eine Mutation dieser Proteine exprimiert.
11. Wirtszelle gemäß Anspruch 10, die eukaryotischen Ursprungs ist.
12. Natives und reifes CD30-Antigen sowie Protein- und Peptidfragmente davon.
13. Durch rekombinante DNA-Verfahren hergestelltes Hybridprotein mit einem Molekülen gemäß Anspruch 12.
14. Mutationen der CD30-Proteine gemäß Anspruch 12 oder 13.
15. Verfahren zur Herstellung von nativem und reifem CD30-Protein, Hybridprotein mit CD30, CD30-Proteinfragment und/oder Mutierungen davon, dadurch gekennzeichnet, daß Wirtszellen gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11 in einem Nährmedium gezüchtet werden und die CD30-Moleküle nach Anreicherung im Nährmedium, in den Zellmembranen oder in den Wirtszellen isoliert werden.
16. Verwendung von CD30-Molekülen gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14 und/oder rekombinant gewonnenen CD30-Molekülen nach Anspruch 15 als Immunogen zur Herstellung Antikörpern und Antisera.
17. Verwendung von CD30-Molekülen gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14 und/oder rekombinant gewonnenen CD30-Molekülen nach Anspruch 15 zur Immunoabsorption.
18. Verwendung von CD30-Molekülen gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14 und/oder dagegen gerichtete Antikörper als Faktoren in der Zellkultur.
19. Verwendung von CD30-Molekülen gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14 zur Untersuchung von chemischen Substanzen auf deren Eigenschaft, an CD30-Antigen zu binden.
20. Verwendung von rekombinant gewonnenem CD30-Antigen gemäß Anspruch 15 oder von CD30-Antigen gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14 als Standard in oder zur Normierung von auf Antikörpern basierenden Verfahren, wie ELISAs, RIAs, etc., zum Nachweis von löslichem CD30-Antigen in Seren oder anderen Körperflüssigkeiten zu diagnostischen Zwecken.
21. Verwendung von CD30-Nucleotidsequenzen zur Herstellung von transgenen Tieren, insbesondere transgenen Nagern, mit einer veränderten Expression an CD30-Antigen ähnlichen Molekülen.
22. Transgene Tiere gemäß Anspruch 17.
23. DNA der DSM 6833.
24. Wirtszelle, die DNA der DSM 6833 enthält.

25. Native und reife Proteine, die mit Hilfe einer DNA der DSM 6833 in vitro oder in vivo hergestellt wurden.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -



FIG. 1

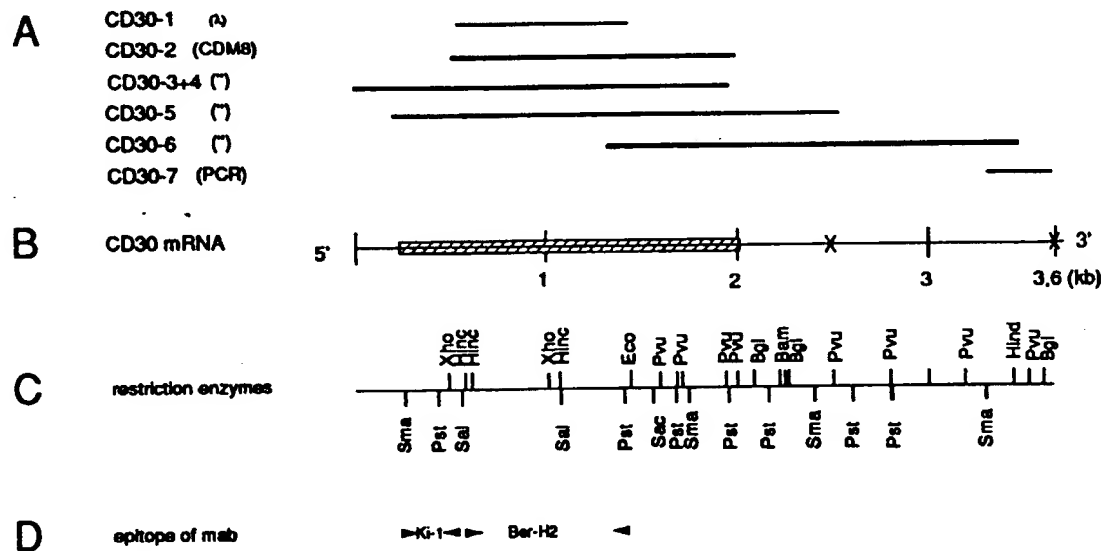
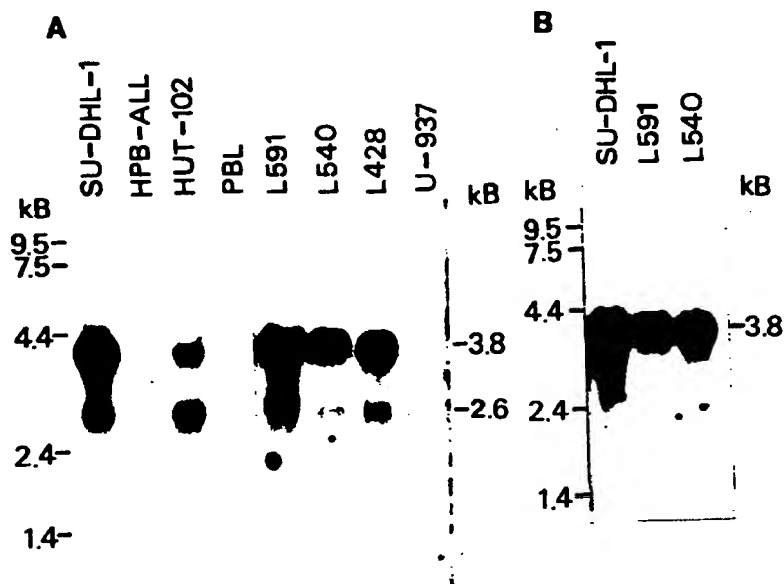


FIG. 3



**FIG. 2**

[illegible]

FIG. 4

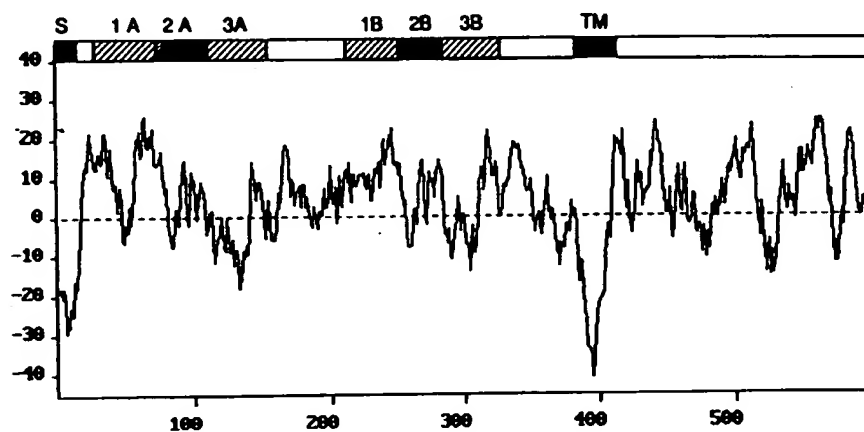


FIG. 6

